

**Labeling DNA fragments during polymerase chain reaction, useful e.g. for sequencing or polymorphic analysis, uses labeled universal primer and sequence-specific primers**

**Patent number:** DE19934084  
**Publication date:** 2001-01-18  
**Inventor:** SCHUELKE MARKUS (DE)  
**Applicant:** UNIVERSITAETSKLINIKUM CHARITE (DE)  
**Classification:**  
- **International:** C12Q1/68  
- **European:** C12Q1/68B2; C12Q1/68D2E  
**Application number:** DE19991034084 19990715  
**Priority number(s):** DE19991034084 19990715

**Report a data error here**

**Abstract of DE19934084**

Labeling DNA fragments (I) during a polymerase chain reaction (PCR) by performing, in a reaction batch, fluorescent labeling with a predetermined set of primers, is new. An Independent claim is also included for test kits for performing the novel method.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

4  
12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 199 34 084 A 1**

51 Int. Cl. 7:  
**C 12 Q 1/68**

21 Aktenzeichen: 199 34 084.6  
22 Anmeldetag: 15. 7. 1999  
43 Offenlegungstag: 18. 1. 2001

71 Anmelder:  
Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin, 10117 Berlin,  
DE  
74 Vertreter:  
Wehlan, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
10315 Berlin

72 Erfinder:  
Schülke, Markus, Dr., 10437 Berlin, DE  
56 Entgegenhaltungen:  
US 57 47 246 A

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Testbesteck zur Markierung von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Testbesteck zur Markierung und zur Multiplexmarkierung - insbesondere zur Fluoreszenzmarkierung - von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion in einem Reaktionsansatz mit Hilfe eines abgestimmten Primerdesigns. Dazu bedient es sich eines markierten Universal-Oligonukleotid-Primers und zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer, von denen ein Primer mit der dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptersequenz versehen ist. Der Ansatz in einem Reaktionsgefäß wird möglich durch ein speziell abgestimmtes Thermocycler-Protokoll.

DE 199 34 084 A 1

Die Erfindung betrifft eine Methode und ein Testbesteck zur Markierung von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion in einem Reaktionsansatz. Dazu bedient sie sich eines markierten Universal-Oligonukleotid-Primers und zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer, von denen ein Primer mit der dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptorsequenz versehen ist.

Bei zahlreichen molekulargenetischen Anwendungen ist es erforderlich, das Vorhandensein oder die Länge von DNA-Fragmenten zu bestimmen (Abkürzungen am Ende des Abschnitts Ausführungsbeispiele). Dieses Ziel wird in der Regel durch eine Kombination von elektrophoretischer Größenauftrennung und anschließender Sichtbarmachung der DNA-Fragmente erreicht. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente existieren unterschiedlichste Methoden (Ethidiumbromid-Färbung, Silberfärbung, Chemilumineszenz, Detektion von radioaktiv markierten Fragmenten mittels eines photographischen Films oder eines Phosphorimagers oder die Fluoreszenzmarkierung). Bei der zunehmenden Automatisierung molekulargenetischer Analysen hat die Fluoreszenzmarkierung eine überragende Bedeutung (Smith et al. [11] – Literatur am Ende des Abschnitts Ausführungsbeispiele). Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente können elektrophoretisch aufgetrennt werden. Nach deren Auftrennung können die an die Fragmente gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe mit Laserlicht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden. Das ausgesandte Fluoreszenzlicht kann detektiert und in ein Signal umgewandelt werden, was spezifisch für den angekoppelten Fluoreszenzfarbstoff ist (Perlin MW [9, 10]).

Hauptanwendungsgebiete dieser Technologie sind die automatische Sequenzierung und die automatische Haplotypisierung/Genotypisierung mittels Mikrosatelliten-Markern (Litt et al. [6]). Die Markierung der DNA-Fragmente für die Haplotypisierung erfolgte bisher mittels einer PCR-Reaktion (PCR – polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion), bei der zwei Oligonukleotid-Primer eingesetzt werden, von denen einer am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist (Weber JL [12]). Beide Primer werden in das PCR-Produkt eingebaut, welches dadurch selbst markiert und mit Laserlicht einer spezifischen Wellenlänge detektierbar wird. Nachteil bei der Verwendung von direkt markierten Oligonukleotid-Primern ist die damit verbundenen hohen Kosten. Die kommerzielle Markierung eines Oligonukleotid-Primers mit einem gewöhnlichen Fluoreszenzfarbstoff (FAM, HEX, TET oder ROX) kostet in der Regel zwischen 160 und 200 DM. Eine Selbstmarkierung ist für viele kleinere Laboratorien nicht praktikabel, da der zusätzliche instrumentelle und manuelle Mehraufwand (DNA-Synthesizer, HPLC-Reinigung) die Kostenersparnis nicht rechtfertigt. Im Rahmen von Genfindungs-Projekten muß man in der Regel durch Kopplungsanalysen an Familienstammbäumen gewisse Kandidatenloci mittels der Analyse polymorpher Mikrosatelliten-Marker einbeziehungsweise ausschließen. Dabei gibt es gegenwärtig die Regel, daß zur Erreichung einer hohen Sicherheit und zum Ausschluß möglicher Rekombinationen mindestens drei polymorphe Mikrosatelliten-Marker sowohl auf der zentromeren als auch auf der telomeren Seite des Kandidatengens untersucht werden müssen. Die Kosten allein für die Fluoreszenzmarkierung der erforderlichen Oligonukleotid-Primer belaufen sich damit auf 960–1200 DM pro Genlocus. Dies stellt eine erhebliche finanzielle Belastung insbesondere für kleinere Arbeitsgruppen dar, welche in der Regel eine hohe Anzahl von verschiedenen Markern zur Feinkartierung eines Genlocus einsetzen, jedoch pro Markierung nur wenig markiertes Oligonukleotid verbrauchen.

Der Erfindung liegen die Aufgaben zugrunde, ein Verfahren und ein Testbesteck zu entwickeln, mit denen eine Markierung von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion möglich wird. Die Aufgaben wurden dadurch gelöst, daß in einem Reaktionsansatz eine Fluoreszenzmarkierung mit einem abgestimmten Primerdesign dergestalt durchgeführt wird, daß ein markierter Universal-Oligonukleotid-Primer und zwei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer eingesetzt werden, von denen ein Primer mit der dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptorsequenz versehen ist.

Erfindungsgemäß werden bei der Amplifikation eines DNA-Fragmentes mittels einer PCR-Reaktion zwei Oligonukleotid-Primer eingesetzt, welche zur zu amplifizierenden DNA-Sequenz genügend komplementär sind, so daß sie spezifisch hybridisieren und von denen ein Oligonukleotid-Primer an seinem 5'-Ende mit einer dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptorsequenz versehen ist. Dabei findet die Markierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß statt, in dem schon zu Beginn der PCR-Reaktion der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer hinzugefügt wird und sowohl die Oligonukleotid-Primerkonzentrationen als auch die PCR-Zyklusbedingungen so gewählt werden, daß der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer in den folgenden PCR-Zyklen in die neu synthetisierten DNA-Fragmente inkorporiert wird.

Bei der Durchführung als Multiplex-Reaktion gelingt es, während der PCR-Reaktion gleichzeitig mehrere Genfragmente zu amplifizieren, zu markieren und zu charakterisieren.

Die Erfindung ist auch so ausgestaltbar, daß ein an den Universal-Oligonukleotid-Primer gekoppeltes Molekül – wie zum Beispiel Dioxxygenin oder Biotin – erst in einer weiteren chemischen oder enzymatischen Reaktion ein Signal generiert.

Die DNA-Fragmente lassen sich mittels des Universal-Oligonukleotid-Primers an einer Festphase immobilisieren. Die DNA kann genomischen oder geklonten Ursprungs sein.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Verfahrens besteht in einer DNA-Quantifizierung, in der automatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten, in der gelelektrophoretischen Trennung und Detektion von markierten DNA-Fragmenten sowie in der Analyse polymorpher DNA-Marker zur Genotypisierung oder Haplotypisierung mit dem Ziel der Identitätsfeststellung, zur Erstellung von Stammbäumen und Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen.

Das erfindungsgemäße Testbesteck zur Markierung von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion eignet sich zur Durchführung des Verfahrens als Einzel- oder Multiplexanalyse. Es enthält markierte Universal-Oligonukleotid-Primer, die sich sowohl in der universellen Adaptorsequenz als auch im Markierungsmolekül unterscheiden:

1. Markierungsmolekül(1)-TAATACGACTCACTATAGGG-3'  
(Adaptorsequenz: T7-Promotorsequenz)
2. Markierungsmolekül(2)-ATTTAGGTGACACTATAG-3'  
(Adaptorsequenz: SP6-Promotorsequenz)

3. Markierungsmolekül(3)-GTTTTCCAAGTCACGACG-3'  
(Adaptorsequenz: M13(-40)-Sequenz)
4. Markierungsmolekül(4)-TGTAACGACGGCCAGT-3'  
(Adaptorsequenz: M13(-21)-Sequenz).

Bei den Markierungsmolekülen 1 bis 4 handelt es sich um einfache Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum (FAM, HEX, TET, ROX) oder um Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen im Falle von Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern. Es lassen sich auch andere zur Markierung benutzte Moleküle einsetzen, die erst in einer weiteren chemischen Reaktion ein Signal erzeugen oder mittels derer die PCR-Fragmente an einer Festphase immobilisiert werden.

Die erfindungsgemäße Methode umfaßt folgende Schritte:

- (1) Amplifikation eines DNA-Fragmentes mittels einer PCR-Reaktion unter Anwendung zweier Oligonukleotid-Primer, welche zur zu amplifizierenden DNA-Sequenz genügend komplementär sind, so daß sie spezifisch hybridisieren und von denen ein Oligonukleotid-Primer an seinem 5'-Ende mit einer dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptorsequenz versehen ist.
- (2) Durchführung der Markierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß, in dem schon zu Beginn der PCR-Reaktion der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer hinzugefügt wird und sowohl die Oligonukleotid-Primerkonzentrationen als auch die PCR-Zyklusbedingungen so gewählt werden, daß der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer in den folgenden PCR-Zyklen in die neu synthetisierten DNA-Fragmente inkorporiert wird.
- (3) Durchführung der erfindungsgemäßen Methode als Multiplex-Reaktion, d. h. daß während einer PCR-Reaktion gleichzeitig mehrere Genfragmente amplifiziert, markiert und charakterisiert werden.
- (4) Durchführung der erfindungsgemäßen Methode, bei denen ein an den Universal-Oligonukleotid-Primer gekoppeltes Molekül (z. B. Dioxxygenin oder Biotin) erst in einer weiteren chemischen oder enzymatischen Reaktion ein Signal generiert.
- (5) Durchführung der erfindungsgemäßen Methode bei der automatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten.
- (6) Durchführung der erfindungsgemäßen Methode, bei denen die DNA-Fragmente mittels des Universal-Oligonukleotid-Primers an einer Festphase immobilisiert werden.
- (7) Anwendung der erfindungsgemäßen Methode zur gelelektrophoretischen Trennung und Detektion von markierten DNA-Fragmenten.
- (8) Anwendung der erfindungsgemäßen Methode bei der Analyse polymorpher DNA-Marker zur Genotypisierung oder Haplotypisierung mit dem Ziel der Identitätsfeststellung, zur Erstellung von Stammbäumen und Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen.
- (9) Anwendung der erfindungsgemäßen Methode zur DNA-Quantifizierung.
- (10) Anwendung der erfindungsgemäßen Methode, wobei die DNA genomischen Ursprunges ist.
- (11) Anwendung der erfindungsgemäßen Methode, wobei die DNA geklonten Ursprunges ist.

Im Hinblick auf die im Vorabschnitt dargestellten Details bisher angewandter Methoden zur DNA-Fragmentmarkierung realisiert die hier dargestellte Methode folgende Ziele:

- (a) Die kostengünstige Markierung von DNA-Fragmenten innerhalb einer PCR-Reaktion mittels eines markierten Universal-Oligonukleotid-Primers und zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer. Die beschriebene Methode bedeutet für den Anwender keinen manuellen oder labortechnischen Mehraufwand, reduziert jedoch durch Anwendung eines speziellen PCR-Protokolls und von speziellen Oligonukleotid-Primern die Kosten pro Genlocus um 80-90%.
- (b) Eine weitere Kosteneinsparung wird durch die Tatsache bedingt, daß der Universal-Oligonukleotid-Primer mit einem Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markiert werden kann, welcher normale Fluoreszenzfarbstoffe bis zu 10-fach an Signalintensität übertrifft. Eine derartige Markierung ist für gängige fluoreszenzmarkierte Primer aufgrund sehr hoher Kosten in der Regel nicht praktikabel. Mittels der in dieser Patentschrift dargestellten Methode können die Vorteile einer Energietransfer-Fluoreszenzmarkierung voll ausgenutzt werden, ohne daß die Kosten für das Gesamtprojekt wesentlich steigen. Die hohe Fluoreszenz-Signalintensität bedingt die Möglichkeit, mit sehr kleinen Probenvolumina zu arbeiten.
- (c) Zur Erzielung optimaler Ergebnisse wird ein spezielles Thermocycling-Protokoll beschrieben, welches die Anlagerungstemperaturen der unterschiedlichen Primer und die Amplifikationsdynamik berücksichtigt.

Die Markierung des Universal-Oligonukleotid-Primers kann am 5'-Ende, am 3'-Ende oder intern mit Fluoreszenzfarbstoffen, jedoch auch mit anderen konventionellen Markierungsmethoden, wie z. B. mit Biotin, per Enzymmarkierung, per radioaktiver Markierung, per Dioxxygenin-Markierung oder durch Immobilisierung an eine Festphase erfolgen.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß die erfindungsgemäße Markierungsmethode eine unmittelbare Fluoreszenzmarkierung möglich macht, d. h. in einem Reaktionsansatz eine Fluoreszenzmarkierung mit den beschriebenen drei Primern durchgeführt werden kann.

Die Primersequenzen hängen von der zu amplifizierenden DNA-Matrize ab und werden im Einzelfall immer neu synthetisiert. Gleich bleibt in jedem Fall die Adaptorsequenz. Bei der Adaptorsequenz kommen verschiedene Sequenzen in Frage: T3-, SP6-, T7-Promotorsequenz oder M13-Sequenz. Es kann auch eine künstliche Sequenz gewählt werden; sie sollte nur nicht im Genom des zu untersuchenden Organismus vorkommen.

Die Merkmale der Erfindung gehen außer aus den Ansprüchen auch aus der Beschreibung hervor, wobei die einzelnen Merkmale jeweils für sich allein oder zu mehreren in Form von Kombinationen vorteilhafte schutzfähige Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Die Kombination besteht aus bekannten (PCR-Methode, Pri-

mer allgemein, Fluoreszenzmarkierung generell, Fluoreszenzmarkierung mit Energietransfer-Primern) und neuen Elementen (das aufeinander abgestimmte Primerdesign, der Reaktionsansatz in einem Reaktionsgefäß, die Verwendung eines markierten Universal-Oligonukleotid-Primers zur Markierung von unterschiedlichsten PCR-Fragmenten, das dafür erforderliche Thermocycler-Protokoll), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Vorteil (synergistischen Effekt) und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß die Markierung in einem Reaktionsgefäß während der normalen PCR-Reaktion erfolgt, bei der ein Genabschnitt amplifiziert wird – d. h., PCR und Markierung gleichzeitig ohne technischen oder manuellen Mehraufwand durchgeführt werden können. Gleichzeitig können die Kosten für größere Markierungsprojekte um bis zu 90% reduziert werden.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1

Die Markierung von PCR-Fragmenten für Haplotyp-Analysen, mittels eines markierten Universal-Oligonukleotid-Primers umfaßt folgende Schritte:

- (1) Isolierung von DNA, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz enthält. Die Isolierung der einzusetzenden DNA-Matrize kann aus genomischer DNA, cDNA, aus einem Klonierungsvektor oder aus den Produkten einer vorangegangenen PCR-Reaktion erfolgen (Miller et al. [7]).
- (2) Synthese von zwei Oligonukleotid-Primern, welche zur zu amplifizierenden Sequenz hinreichend komplementär sind, so daß mit ihnen eine PCR-Reaktion durchgeführt werden kann. An einem dieser beiden Primer wird am 5'-Ende eine Adaptorsequenz von 18–20 bp angehängt, welche im Genom des zu untersuchenden Organismus möglichst nicht vorkommen sollte.
- (3) Synthese des Universal-Oligonukleotid-Primers, welcher aus der homologen o. g. Adaptorsequenz besteht und an seinem 5'-Ende, seinem 3'-Ende oder intern mit einem Molekül markiert ist. Die bevorzugte Markierung ist die Energietransfer-Fluoreszenzmarkierung (Hung et al. [2], Ju et al. [3], Kwok PY [4]).
- (4) Die o. g. drei Oligonukleotid-Primer werden in einem Reaktionsansatz mit Matritzen-DNA, PCR-Puffer und Magnesiumchlorid gemischt. Hierbei ist zu beachten, daß die Konzentration des Oligonukleotid-Primers, welcher die Adaptorsequenz trägt, deutlich geringer sein muß als die des anderen Oligonukleotid-Primers und des markierten Universal-Oligonukleotid-Primers. Idealerweise beträgt die Konzentration des Oligonukleotid-Primers mit Adaptorsequenz 1/4 der molaren Konzentration der übrigen beiden Primer.
- (5) Die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Fragmente erfolgt mit der Polymerase-Kettenreaktion oder PCR-Methode (Mullis KB [8]): Nach Denaturierung der Matritzen-DNA bei 94°C für 5 Minuten wird die PCR-Reaktion unter Hinzugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase gestartet. Die Zyklusbedingungen der ersten 30 Zyklen richten sich nach der Natur der zu amplifizierenden DNA und der verwendeten Oligonukleotid-Primersequenzen. Gegebenenfalls müssen diese Zyklusbedingungen experimentell optimiert werden.
- (6) Für die anschließenden 8 PCR-Zyklen wird die Anlagerungstemperatur so weit abgesenkt, daß sich der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer auf die der Adaptorsequenz komplementären Sequenz anlagern kann und die Funktion des "verbrauchten" Oligonukleotid-Primers mit Adaptorsequenz "übernehmen" kann.
- (7) Das fertige PCR-Produkt, welches den markierten Universal-Oligonukleotid-Primer inkorporiert hat, kann nun mit unterschiedlichen Methoden weiter analysiert werden.
- (8) Zur Genotypanalyse mittels polymorpher Mikrosatelliten-Marker wird ein Aliquot des markierten PCR-Produktes mit Formamid versetzt und durch Erhitzung auf 94°C für 5 Minuten und anschließender Schockkühlung auf 4°C denaturiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt bevorzugt durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Detektion der Fragmente durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge, welche die inkorporierte(n) Fluoreszenzgruppe(n) spezifisch anregt. Das ausgesandte Fluoreszenzlicht kann durch eine geeignete Apparatur registriert und in ein elektrisches Signal verwandelt werden. Dieses Signal korrespondiert mit der Art, der Länge und der Konzentration der untersuchten markierten DNA-Fragmente (Perlin MW [9, 10]).
- (9) Weitere Anwendungsgebiete der beschriebenen Markierungsmethode sind:
  - Erstellung von Stammbäumen, Identitätsfeststellung und Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen mittels Analyse polymorpher Mikrosatelliten-Marker oder SNPs.
  - Multiplexing der beschriebenen Markierungsmethode. Das heißt, daß während einer PCR-Reaktion durch Anwendung geeigneter Oligonukleotid-Primerpaare gleichzeitig mehrere DNA-Fragmente amplifiziert und markiert werden können (Levitt R [6]).
  - DNA-Quantifizierung und Amplifikations-Kinetik Analyse durch Messung der Fluoreszenzzunahme des via markierten Universal-Oligonukleotid-Primers inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffes in das PCR-Produkt.
  - Anwendung der beschriebenen Methode bei der Sequenzierung von DNA-Fragmenten mittels 5'-End-Markierung durch den markierten Universal-Oligonukleotid-Primer und der Anwendung von Didesoxynukleotid Terminatoren.
  - Anwendungen, bei denen PCR-Fragmente mittels des eingebauten markierten Universal-Oligonukleotid-Primers an einer Festphase immobilisiert werden können. Dies könnte durch Markierung des Universal-Oligonukleotid-Primers mit einem Molekül bewerkstelligt werden, welches später mit einem anderen Molekül, welches an eine Festphase gekoppelt ist eine feste chemische Bindung eingeht. (z. B. Biotin-Markierung des Universal-Oligonukleotid-Primers und nachfolgende Bindung des markierten PCR-Produktes an eine Streptavidin-beschichtete Festphase).
  - Anwendungen, bei denen mit dem Universal-Oligonukleotid-Primer markierte PCR-Fragmente jeglicher

Herkunft elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert werden müssen. (bei der RFLP-Analyse, Restriktionsenzym-Analysen, Mutationsanalysen durch PCR-PIRA)

## Beispiel 2

Das im folgenden ausgeführte Experiment beschreibt die Markierung und Analyse eines polymorphen Mikrosatelliten-Markers des MaoA-Locus (GenBank X55451) auf dem X-Chromosom anhand eines informativen Stammbaumes (Fig. 3): Die Isolierung von menschlicher genomischer gesamt-DNA aus kernhaltigen Blutzellen erfolgt nach Standard-Protokollen (z. B. Miller et al. [7]). Über die Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen des untersuchten Stammbaumes gibt Fig. 3 Auskunft. Als Primer für die anschließende PCR-Reaktion werden folgende Oligonukleotide benutzt, welche nach Standardmethoden kommerziell synthetisiert wurden:

- (1) Ein fluoreszenz (FAM) markierter Universal-Oligonukleotid-Primer: FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' (UNI). Die unterstrichene Sequenz oder "M13(-21)" genannte Sequenz, auch als Adaptorsequenz bezeichnet, entspricht der -21 Promotorsequenz des M13-Phagen und kommt im menschlichen Genom natürlicherweise nicht vor.
- (2) Zwei Mikrosatelliten-Marker spezifische (Black et al. Nucleic Acids Res 1986; 19, 689) Oligonukleotid-Primer, von denen der Vorwärtsprimer (VOR) 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA GAC TAG ACA AGT TGC A-3' an seinem 5'-Ende mit der oben beschriebenen M13(-21)-Adaptorsequenz gekoppelt ist und der Rückwärtsprimer (REV) 5'-CAC TAT CTT GTT AGC TCA CT-3'.

Der PCR-Reaktionsansatz enthält in 50 µl Gesamtvolumen: 5 µl Taq spezifischen PCR-Puffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (– Desoxynukleotidtriphosphate – equimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 ng genomische DNA, je 8 pmol UNI- und REV-Primer und 2 µmol FOR-Primer. Um eine unspezifische Bindung der DNA-Polymerase zu verhindern, wird der PCR-Reaktionsansatz zunächst für 5 Minuten auf 94°C erwärmt und erst dann 1 U Taq-Polymerase hinzugefügt. Nach Hinzugabe der Taq-Polymerase startet das folgende Thermocycler-Protokoll:

30 Zyklen:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 94°C

Primerbindung: 45 Sekunden bei 56°C

Elongation: 45 Sekunden bei 72°C

Im Anschluß daran werden noch weitere 8 Zyklen mit folgender Charakteristik durchlaufen:

Denaturierung: 30 Sekunden bei 94°C

Primerbindung: 45 Sekunden bei 53°C

Elongation: 45 Sekunden bei 72°C

Der abschließende Elongationsschritt wird bei 72°C über 10 Minuten durchgeführt.

1 µl des PCR-Produktes wird mit 20 µl deionisiertem Formamid und 0.5 µl eines 50 bp ROX Standard (Perkin Eimer) vermischt. Nach 2 minütiger Erhitzung auf 94°C und anschließender Schockkühlung im Eisbad wird die Probe auf einem Kapillarsequenzierungsgerät (z. B. ABI 310 Prism Genetic Analyzer) oder einem Gelsequenzierungsgerät (z. B. ABI 377 Prism Genetic Analyzer) mit Laserdetektion analysiert.

Die Originalausdrucke des ABI 310 Prism Genetic Analyzers sind in Fig. 4 dargestellt. Die aus der Analyse resultierenden Haplotypen sind im Stammbaum (Fig. 3) dargestellt. Die Haplotypenverteilung ist vereinbar mit einem X-chromosomalen Erbgang mit zwei Allelen bei Frauen und einem Allel bei Männern. Bei den Individuen II.2 und III.1 konnte nur bereits lange gelagerte, degenerierte DNA zur Amplifikation verwendet werden. Es resultierten eine etwas geringere Signalintensität und ein Amplifikationsartefakt vor dem eigentlichen Signal, welcher jedoch in keiner Weise mit dem Signal interferierte oder die Ablesegenauigkeit beeinträchtigte. Alle Signale zeigen die bei Dinukleotid-Repeats üblichen Stotter-Peaks in 2 bp Abständen, welche unter Verwendung von direkt markierten Primern ebenso auftreten.

## Beschreibung der Figuren

Fig. 1

### Darstellung der benutzten Primer

- (a) Vorwärts-Primer: der gewellte Anteil stellt die universelle Adaptorsequenz dar (z. B. die M13(-21)-Sequenz), der schraffierte Anteil stellt die genspezifische Oligonukleotidsequenz dar.
- (b) Rückwärts-Primer: der schraffierte Anteil stellt die genspezifische Oligonukleotidsequenz dar. Nota bene: die Länge der genspezifischen Oligonukleotidsequenzen wird so gewählt, daß sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsprimer ähnliche Anlagerungstemperaturen haben, welche zwischen 55 und 65°C liegen sollten.
- (c) Markierter Universal-Oligonukleotid-Primer: der gewellte Anteil stellt die universelle Adaptorsequenz dar, der Stern stellt die angekoppelte Markierung dar, welche einem Fluoreszenzfarbstoff, einem Radionuklid, Biotin oder einem anderen Molekül entsprechen kann, das später in einer Indikatorreaktion verwendet wird.

Fig. 2

### Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe

- (a) Zunächst lagern sich nach Schmelzen der DNA-Matrize der Vorwärts- und Rückwärts-Primer mit ihrer genspezifischen Sequenz an und werden in 3'-Richtung durch die thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Während die-

ser ersten PCR-Zyklen wird die Adaptorsequenz des Vorwärts-Primers in das PCR-Produkt eingebaut.

(b) Die molare Konzentration der Primer ist so berechnet, daß von dem Vorwärts-Primer nur ein Viertel der Konzentration des Rückwärts- und des Universal-Oligonukleotid-Primers eingesetzt wird. Dies führt dazu, daß der Vorwärts-Primer nach etwa 25 Zyklen verbraucht ist. Da zwischenzeitlich durch den Vorwärtsprimer jedoch die Adaptorsequenz mit in die PCR-Produkte inkorporiert wurde, kann sich nun der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer spezifisch anlagern und die Funktion des Vorwärts-Primers "übernehmen". Da der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer jedoch eine geringere Schmelztemperatur hat, muß die Temperatur bei den folgenden 8-10 Zyklen für die Anlagerungsreaktion auf 53°C abgesenkt werden.

(c) Das fertige PCR-Endprodukt ist nun an seinem 5'-Ende markiert und um die Anzahl der Basenpaare der Adaptorsequenz länger als ein vergleichbares PCR-Produkt, welches nur mit den rein sequenzspezifischen Oligonukleotiden (schrattierte Anteile der Primer) generiert worden wäre. Das heißt, vergleicht man die ermittelten Sequenzlängen für polymorphe Mikrosatelliten-Marker mit der publizierten Allelfrequenz, muß man die Anzahl der Basen der Adaptorsequenz (z. B. 18 Basen bei der M13(-21)-Sequenz) von den experimentell ermittelten Fragmentlängen abziehen. Wurde mit der Taq-Polymerase amplifiziert, muß man noch zusätzlich eine weitere Base abziehen, die durch den 3'-terminalen Adenosin-Überhang verursacht wird.

Fig. 3

Stammbaum der untersuchten Familie: unter den Symbolen der Familienmitglieder sind die entsprechenden Haplotypen für den MaoA Locus dargestellt. Die Zahlen bezeichnen die Längen des entsprechenden MaoA polymorphen Dinucleotid-Repeat Mikrosatelliten-Markers. Gleiche Haplotypen sind durch entsprechende Muster der Haplotyp-Balken dargestellt. Da es sich um einen X-chromosomalen Marker handelt, besitzen die männlichen Familienangehörigen nur ein Allel.

Fig. 4

Original Kurvenausdrucke des ABI 310 Genetic Analyzers. Auf der rechten Skala ist die relative Signalintensität dargestellt. Die bei den Experimenten eingesetzte DNA der Familienmitglieder II.2 und III.1 war aufgrund langer Lagerung degeneriert. Dies resultierte in einem Kurvenartefakt und einer niedrigeren Signalstärke. Die Ablesegenauigkeit war dadurch jedoch in keiner Weise beeinträchtigt. Die durch Elektrophorese und Laserdetektion ermittelten Fragmentlängen werden durch die Gerätesoftware automatisch detektiert und berechnet. Als Bezugsgröße wird der höchste Peak gewählt, dessen jeweilige Fragmentgröße in dem Kästchen darunter angezeigt ist. Die Fragmentlängen segregieren mit den Verwandtschaftsverhältnissen der Familie, wie in Fig. 3 dargestellt.

#### Abkürzungen

PCR polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)

DNA desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTPs Desoxynukleotidtriphosphate (equimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

FAM (Fluoreszenzfarbstoff) 6-Carboxyfluorescein

HEX (Fluoreszenzfarbstoff) Hexachloro-6-Carboxyfluorescein

U Unit (Aktivitätseinheit für Enzyme)

bp Basenpaar

SNP single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)

RFLP restriction fragment length polymorphism (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)

PIRA primer induced restriction analysis (Restriktionsanalyse mittels durch PCR-Primer eingeführte Restriktionsschnittstellen)

ROX (Fluoreszenzfarbstoff) 6-Carboxy-X-Rhodamin

TET (Fluoreszenzfarbstoff) Tetrachloro-6-Carboxyfluorescein

#### Literatur

- [1] Black GCM, Chen ZY, Craig IW, Powell JF. Dinucleotide repeat at the MaoA locus. *NucleicAcidsRes* 1991, 19: 689
- [2] Hung SC, Mathies RA, Glazer AN. Optimization of spectroscopic and electrophoretic properties of energy transfer primers. *Anal Biochem* 1997, 252: 78-88
- [3] Ju J, Glazer AN, Mathies RA. Energy transfer primers: a new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis. *Nature Med* 1996, 2: 246-249
- [4] Kwok PY. Method for nucleic acid analysis using fluorescence resonance energy transfer. International patent: WO 97/22719
- [5] Levitt R. Genotyping by simultaneous analysis of multiple microsatellite loci. International patent: WO 95/15400
- [6] Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am JHum Genet* 1989, 44: 397-401
- [7] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16: 1215
- [8] Mullis KB. Process for amplifying nucleic acid sequences. USpatent: US 4,683,202
- [9] Perlin MW. Method and system for genotyping. US patent: US 5,876,933
- [10] Perlin MW. Method and apparatus for analyzing genetic material. International patent: WO 95/21269
- [11] Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986,



## Patentansprüche

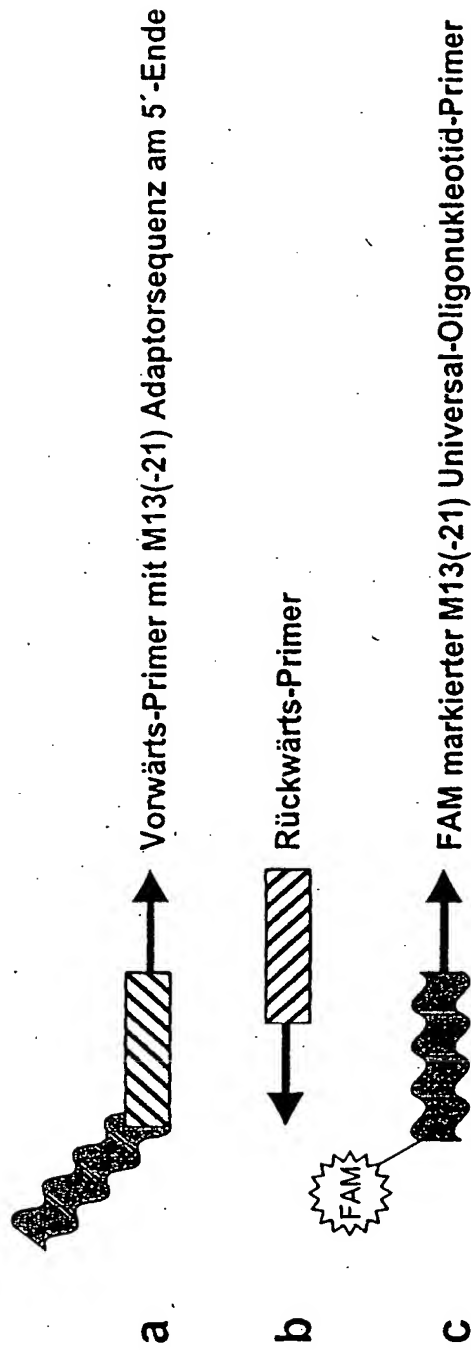
1. Verfahren zur Markierung von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem Reaktionsansatz eine Fluoreszenzmarkierung mit einem abgestimmten Primerdesign durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zu dem abgestimmten Primerdesign drei Primer gehören, bei denen es sich um einen markierten Universal-Oligonukleotid-Primer und um zwei sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer handelt, von denen ein Primer mit der dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptorsequenz versehen ist.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, gekennzeichnet durch die Amplifikation eines DNA-Fragmentes mittels einer PCR-Reaktion unter Anwendung zweier Oligonukleotid-Primer, welche zur zu amplifizierenden DNA-Sequenz genügend komplementär sind, so daß sie spezifisch hybridisieren und von denen ein Oligonukleotid-Primer an seinem 5'-Ende mit einer dem Universal-Oligonukleotid-Primer homologen Adaptorsequenz versehen ist.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierungsreaktion in einem Reaktionsgefäß, in dem schon zu Beginn der PCR-Reaktion der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer hinzugefügt wird und sowohl die Oligonukleotid-Primerkonzentrationen als auch die PCR-Zyklusbedingungen so gewählt werden, daß der markierte Universal-Oligonukleotid-Primer in den folgenden PCR-Zyklen in die neu synthetisierten DNA-Fragmente inkorporiert wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4 als Multiplex-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß während einer PCR-Reaktion gleichzeitig mehrere Genfragmente amplifiziert, markiert und charakterisiert werden.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein an den Universal-Oligonukleotid-Primer gekoppeltes Molekül – wie zum Beispiel Dioxxygenin oder Biotin – erst in einer weiteren chemischen oder enzymatischen Reaktion ein Signal generiert.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Fragmente mittels des Universal-Oligonukleotid-Primers an einer Festphase immobilisiert werden.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA genomischen Ursprunges ist.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA geklonten Ursprunges ist.
10. Verwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur automatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten.
11. Verwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur gelelektrophoretischen Trennung und Detektion von markierten DNA-Fragmenten.
12. Verwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 9 bei der Analyse polymorpher DNA-Marker zur Genotypisierung oder Haplotypisierung mit dem Ziel der Identitätsfeststellung, zur Erstellung von Stammbäumen und Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen.
13. Verwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur DNA-Quantifizierung.
14. Testbesteck zur Markierung von DNA-Fragmenten während einer PCR-Reaktion zur Durchführung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 9 als Einzel- oder Multiplexanalyse, enthaltend markierte Universal-Oligonukleotid-Primer, die sich sowohl in der universellen Adaptorsequenz als auch im Markierungsmolekül unterscheiden.
15. Testbesteck nach Anspruch 14, enthaltend
  - 15.1 vier markierte, insbesondere fluoreszenzmarkierte, Universal-Oligonukleotid-Primer, die sich sowohl in der universellen Adaptorsequenz als auch im Markierungsmolekül unterscheiden:
    - 15.1.1 Markierungsmolekül(1)-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (Adaptorsequenz: T7-Promotorsequenz)
    - 15.1.2 Markierungsmolekül(2)-ATTTAGGTGACACTATAG-3 (Adaptorsequenz: SP6-Promotorsequenz)
    - 15.1.3 Markierungsmolekül(3)-GTTTTCCAAGTCACGACG-3' (Adaptorsequenz: M13(-40)-Sequenz)
    - 15.1.4 Markierungsmolekül(4)-TGTAACACGACGGCCAGT-3' (Adaptorsequenz: M13(-21)-Sequenz).
16. Testbesteck nach den Ansprüchen 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Markierungsmolekülen 15.1.1 bis 15.1.4 um einfache Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum (FAM, HEX, TET, ROX) oder um Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen im Falle von Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern handelt.
17. Testbesteck nach den Ansprüchen 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß zur Markierung Moleküle eingesetzt werden, die erst in einer weiteren chemischen Reaktion ein Signal erzeugen oder mittels derer die PCR-Fragmente an einer Festphase immobilisiert werden.

---

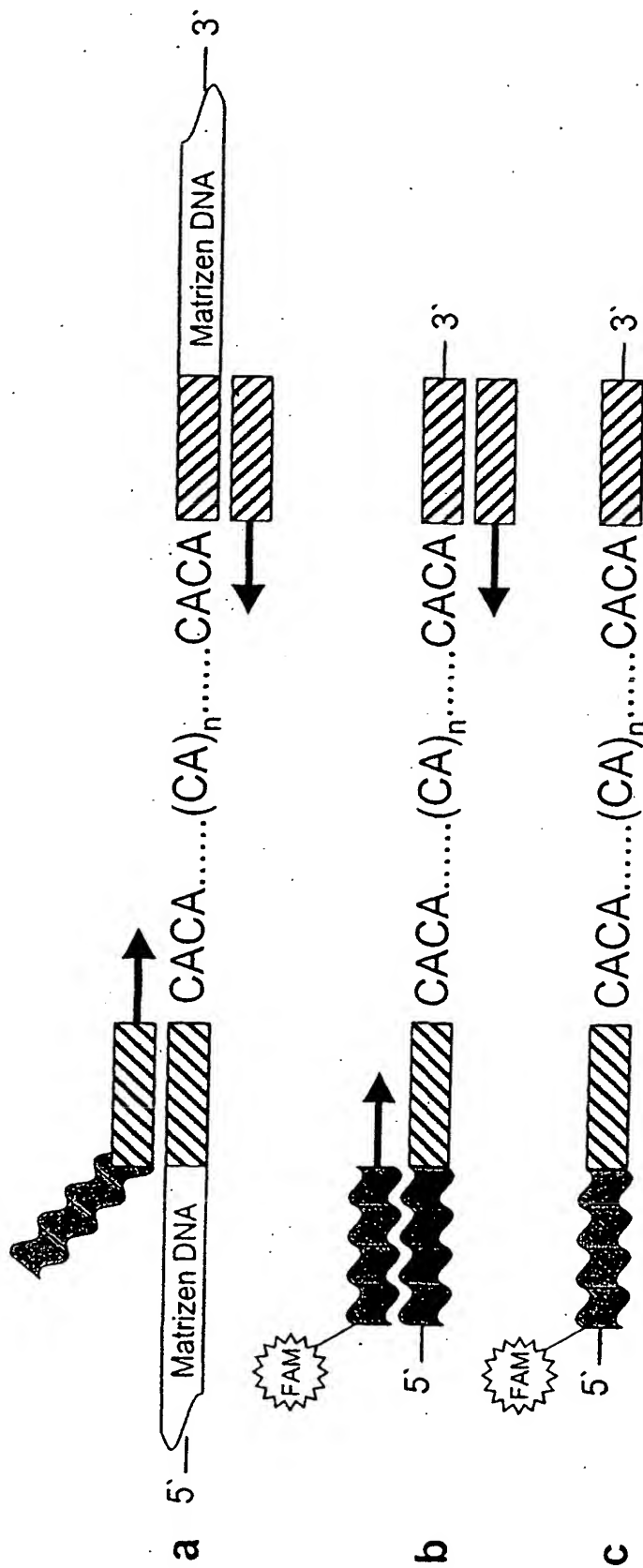
Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---

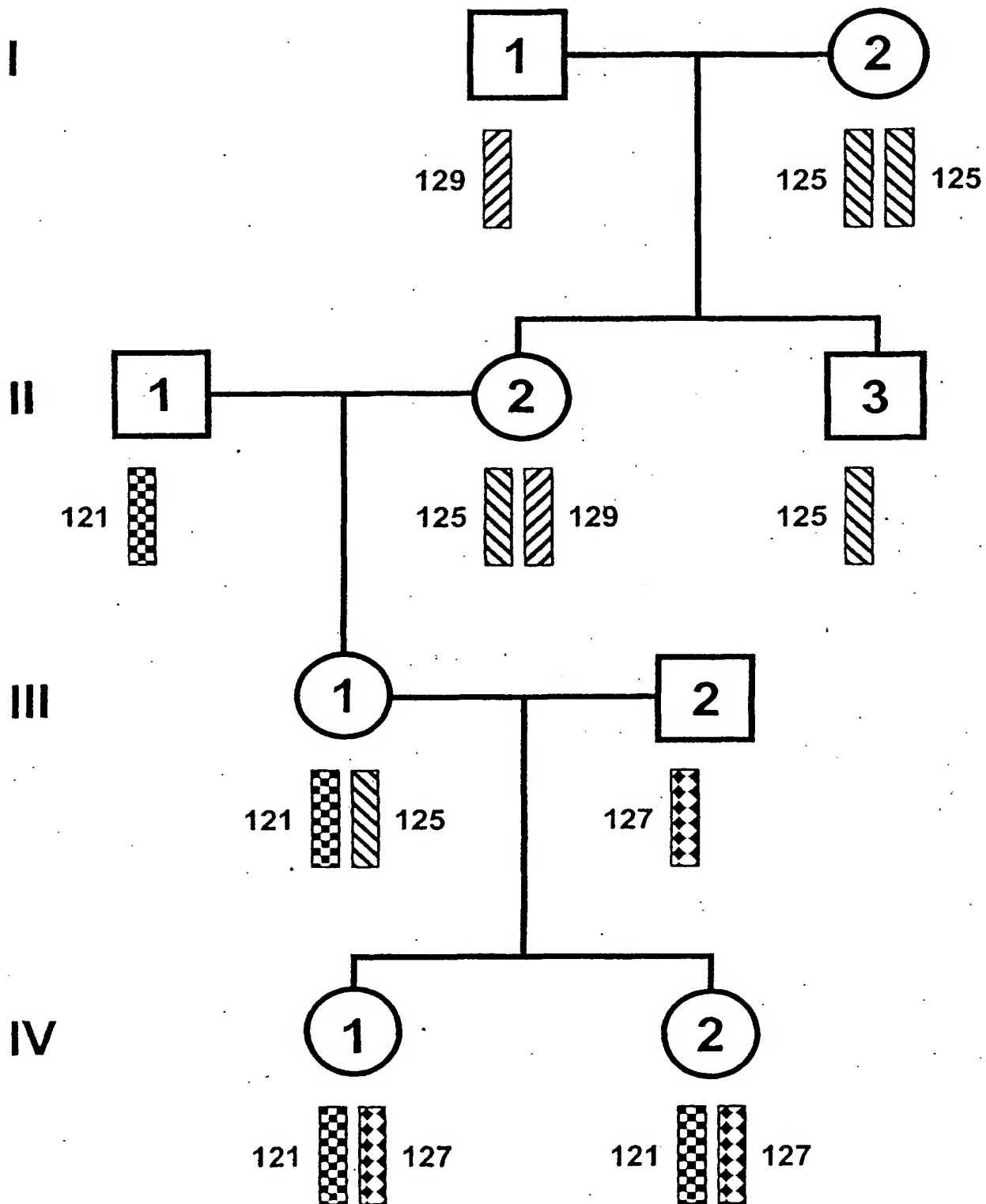
- Leerseite -



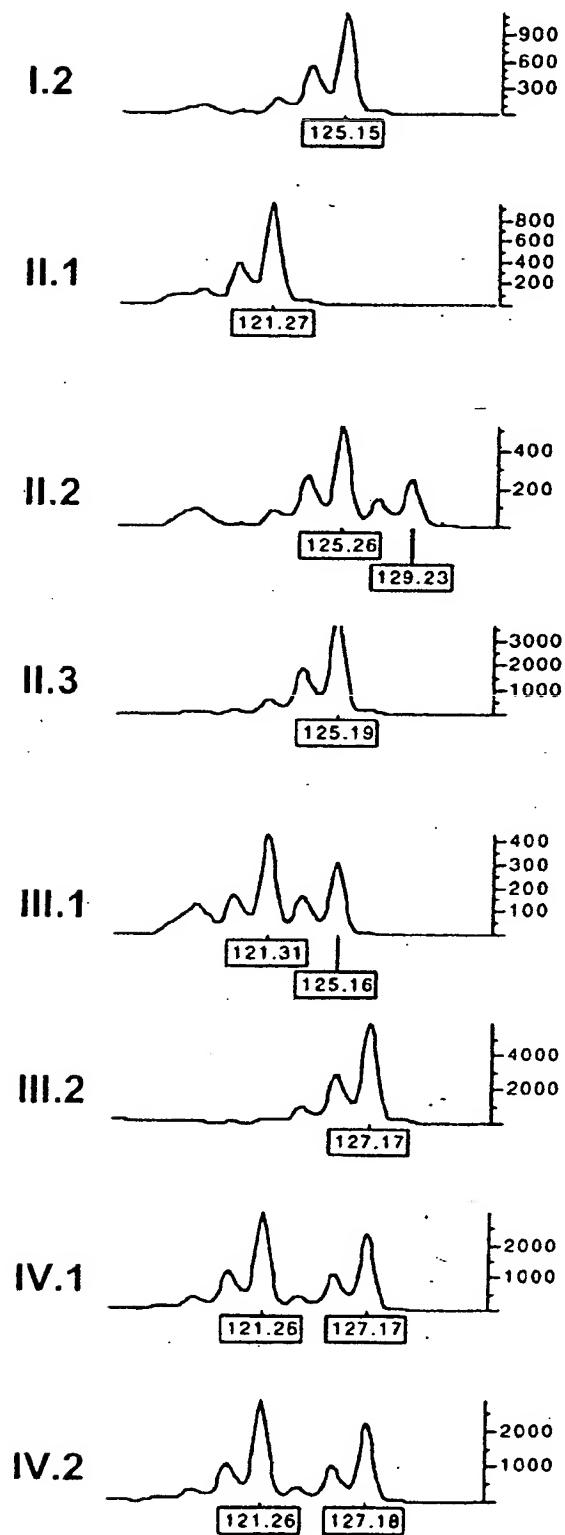
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**